

**Bibliographic Information**

**Novel human 26S proteasome and its preparation.** Tanaka, Keiji; Niihara, Naoki. (Bio Material Kenkyusho Kk, Japan). Jpn. Kokai Tokkyo Koho (1993), 9 pp. CODEN: JKXXAF JP 05292964 A2 19931109 Heisei. Patent written in Japanese. Application: JP 92-128000 19920422. CAN 120:100551 AN 1994:100551 CAPLUS (Copyright 2003 ACS on SciFinder (R))

**Patent Family Information**

<u>Patent No.</u>	<u>Kind</u>	<u>Date</u>	<u>Application No.</u>	<u>Date</u>
JP 05292964	A2	19931109	JP 1992-128000	19920422
JP 3125235	B2	20010115		

Priority Application

JP 1992-128000	19920422
----------------	----------

**Abstract**

A novel human 26S proteasome is prepd. from kidney and characterized. Sepn. of 26S proteasome from human organs or cells employs solns. contg. glycerin, 2-mercaptoethanol, dithiothreitol, and ATP with the aids of gel filtration chromatog., hydroxyapatite column chromatog., ionic exchanger, or centrifugation in glycerol with gradient concn. The purified proteasome exhibiting a mol. wt. of 2000 kDa is comprised of 21.apprx.31-kDa 20S proteasome and other regulatory components of 35.apprx.110 kDa. It is able to degrade ATP and the ubiquitin-bound proteins in the presence of ATP. Its activities as ATPase and protease were also demonstrated and the electronmicroscopic morphol. was obsd.

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-292964

(43)公開日 平成5年(1993)11月9日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 9/64		Z 7823-4B		
// A 6 1 K 37/54	ADU	8314-4C		

審査請求 未請求 請求項の数3(全 9 頁)

(21)出願番号 特願平4-128000

(22)出願日 平成4年(1992)4月22日

(71)出願人 591082269

株式会社バイオマテリアル研究所  
神奈川県横浜市栄区田谷町1番地

(72)発明者 田中 啓二

徳島県徳島市下町本丁206番地

(72)発明者 新原 直樹

神奈川県横浜市栄区田谷町1番地 株式会  
社バイオマテリアル研究所内

(74)代理人 弁理士 須藤 政彦

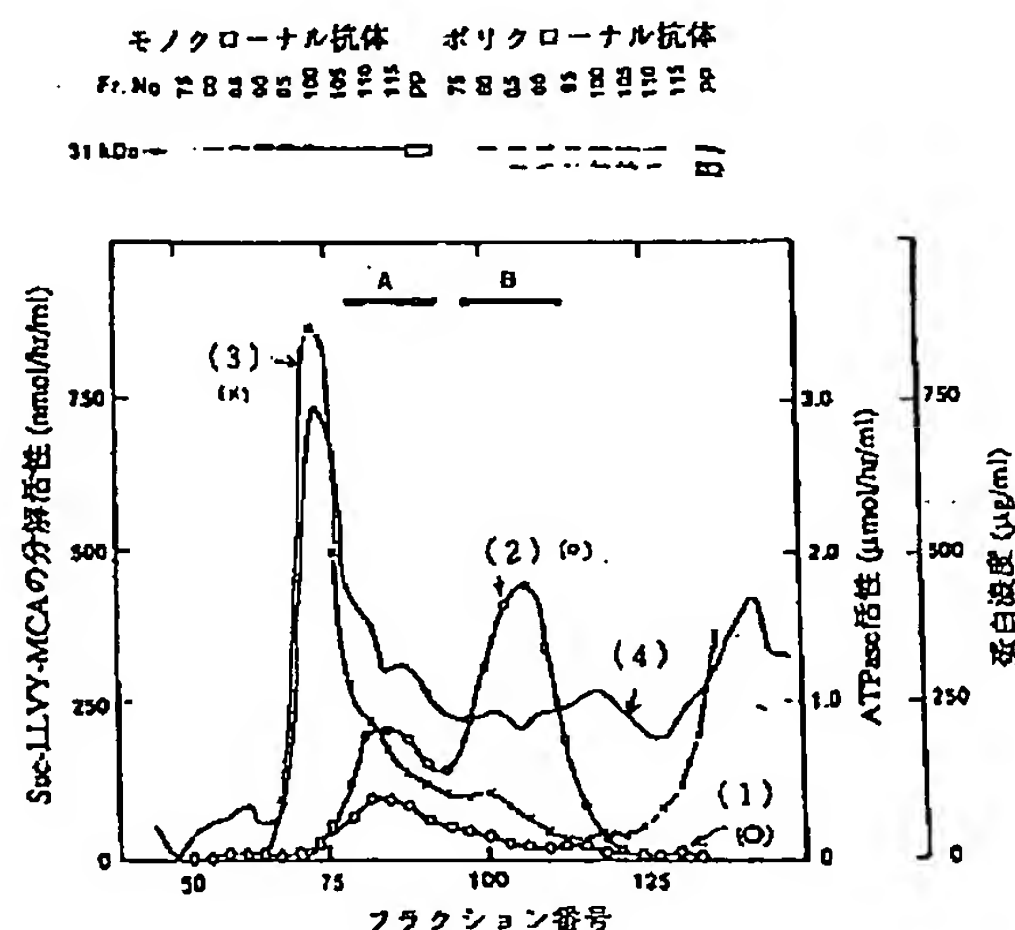
(54)【発明の名称】 ヒト26Sプロテアソーム

(57)【要約】

【目的】 ユビキチン結合蛋白質を分解する新規細胞内多機能プロテアーゼのヒト26Sプロテアソーム、およびその安定な状態で精製する製造方法を提供する。

【構成】 ユビキチンが結合した蛋白質をATP存在下で分解する活性を有し、分子量は、約2,000kDa(キロダルトン)で、21-31kDaの20Sプロテアソームと、それ以外に分子量35-110kDaの制御因子蛋白質群より構成されるヒト26Sプロテアソーム。ヒト臓器および細胞の細胞質画分より、グリセリン、2-メルカプトエタノールあるいはシチオスレイトール、およびATPを添加した分離溶媒を用いてゲル濾過カラム等により精製する。

【効果】 ユビキチン化した蛋白質の分解機構等の解明に有用であり、かつ、分離、精製の困難な26Sプロテアソームを安定な状態で精製、単離できる。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の酵素学および物理学的性質を有するヒト26Sプロテアソーム。

- ① ユビキチンが結合した蛋白質をATP存在下で分解する活性を有する：
- ② ATPを分解する活性を有する：
- ③ 超遠心法で測定した沈降係数は26Sである：
- ④ 分子量は約2000kDa（キロダルトン）で、21-31kDaの20Sプロテアソームと、それ以外に分子量35-110kDaの制御因子蛋白質群より構成される：
- ⑤ 電子顕微鏡で観察した分子形状はダンベル状で、その中央部にプロテアソームの構造が認められる：

【請求項2】 ヒト臓器、細胞の細胞質画分より安定な状態で精製されたヒト26Sプロテアソームを製造する方法において、グリセリン、2-メルカプトエタノールあるいはジチオスレイトール、およびATPを添加した分離溶媒を用いた物理化学的分離方法により精製することを特徴とする前記請求項1に記載されたヒト26Sプロテアソームの製造方法。

【請求項3】 物理化学的分離方法が、ゲル濾過カラム、ハイドロキシアパタイトカラム、イオン交換カラム、グリセロール密度勾配遠心から選択される1種以上を用いたものである前記請求項2に記載されたヒト26Sプロテアソームの製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、ヒト26Sプロテアソームに関するものであり、さらに詳しくは、ATP依存的にユビキチン結合蛋白質を分解する新規な細胞内多機能プロテアーゼに関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】細胞内で不必要あるいは異常な蛋白質が分解される機構として、ユビキチン依存的分解経路が知られている〔Rechsteiner, M. ed., Ubiquitin, Plenum, New York (1988)〕。ユビキチンは分子量約8,500の蛋白質で、真核生物の細胞に普遍的に存在し、種々の蛋白質にイソペプチド結合し、分解のための目印となる。このユビキチンによる蛋白質の修飾および分解にはATPをエネルギー源として必要とすることがわかっている。しかしながら、このユビキチン化した蛋白質を分解する酵素の実体については明かになっていないことから、このような、ユビキチン化した蛋白質を分解する機構が解明できれば、細胞内における不必要あるいは異常な蛋白質の動態を把握することが可能となり、さらに、各種病態の診断、および治療法を確立する上で、きわめて有益であり、その解明が、強く要請されていた。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】そこで、本発明者等

は、これまで、構造が解明されていないユビキチン化した蛋白質を分解する酵素の詳細を明かにすることを目標とし、鋭意研究を積み重ねた結果、当該蛋白質を分解する酵素として、ヒト26Sプロテアソームを見い出すと共に、これを精製し、単離することに成功して本発明を完成するに至った。

【0004】すなわち、本発明は、ユビキチン化した蛋白質を分解する新規な細胞内多機能プロテアーゼであるヒト26Sプロテアソームを提供することを目的とするものである。また、本発明は、当該酵素を安定に製造する方法およびその酵素学および物理学的性質も提供することを目的とするものである。さらに、本発明は、ヒト26Sプロテアソームの詳細を明らかにすることにより、当該酵素の機能とユビキチン化した蛋白質の分解機構の解明に役立つのみならず、各種病態の診断、および治療法として、役立つ新しい技術を提供することを目的とするものである。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】このような目的を達成するための本発明の構成は、以下の(1)～(2)からなる。

(1) 下記の酵素学および物理学的性質を有するヒト26Sプロテアソーム。

- ① ユビキチンが結合した蛋白質をATP存在下で分解する活性を有する：
- ② ATPを分解する活性を有する：
- ③ 超遠心法で測定した沈降係数は26Sである：
- ④ 分子量は約2000kDa（キロダルトン）で、21-31kDaの20Sプロテアソームと、それ以外に分子量35-110kDaの制御因子蛋白質群より構成される：
- ⑤ 電子顕微鏡で観察した分子形状はダンベル状で、その中央部にプロテアソームの構造が認められる：

【0006】(2) ヒト臓器、細胞の細胞質画分より安定な状態で精製されたヒト26Sプロテアソームを製造する方法において、グリセリン、2-メルカプトエタノールあるいはジチオスレイトール、およびATPを添加した分離溶媒を用いた物理化学的分離方法により精製することを特徴とする前記(1)に記載されたヒト26Sプロテアソームの製造方法。

【0007】(3) 物理化学的分離方法が、ゲル濾過カラム、ハイドロキシアパタイトカラム、イオン交換カラム、グリセロール密度勾配遠心から選択される1種以上を用いたものである前記(2)に記載されたヒト26Sプロテアソームの製造方法。

【0008】続いて、本発明についてさらに詳細に説明する。本発明者等は、これまで、構造が解明されていないユビキチン化した蛋白質を分解する酵素の詳細を明かにすることを目標とし、鋭意研究を重ねてきた。その結果、本発明により、当該酵素は、既に本発明者等が報告

した20Sプロテアソーム(多機能プロテアーゼ、分子量約750kDa) [Tanaka K., et al., J.Mol. Biol., 203, 985-996 (1988)]と未知機能をもった制御因子が結合した巨大な複合体であることがわかり、本発明者等は、26Sプロテアソーム(分子量約2,000kDa)と命名した。

【0009】20Sプロテアソームは、同一分子内に複数の触媒活性をもつ多成分複合体プロテアーゼであり、また酸性、塩基性、中性のアミノ酸を分解する多機能性プロテアーゼでもあるが、ユビキチン化した蛋白質を分解する活性はなかった。従って、本発明26Sプロテアソームは、プロテアーゼとしての20Sプロテアソームが、制御因子と結合することにより、ユビキチン化した蛋白質を識別して、分解するという新しい機能を獲得していることがわかった。さらに、当該酵素の新しい機能として、ATPase活性をもつことが明かになった。

【0010】本発明のヒト26Sプロテアソームは、これを用いることにより、当該酵素の機能とユビキチン化した蛋白質の分解機構の解明に役立つのみならず、各種病態の診断および治療法として役立つ技術が提供される。26Sプロテアソームの主要な機能は、ユビキチンが結合した蛋白質を分解する活性をもつことであるが、最近、癌遺伝子や細胞周期関連遺伝子がこのユビキチン依存性の分解経路で分解されることが報告され注目されている。これら蛋白質の例としては、c-myc癌遺伝子産物、p53癌抑制遺伝子産物 [Scheffner M., et al., Cell, 63, 1129-1136(1990)]、cdc2キナーゼ調節蛋白質であるサイクリン [Clotzer M., et al., Nature, 349, 132-138 (1991)]などが挙げられる。従って、本発明のヒト26Sプロテアソームを用いることにより、癌化のメカニズムの解明や癌の治療および診断に有用である。

【0011】また、アルツハイマー病患者の脳内にはユビキチン化した蛋白質が異常蓄積しており、少なくとも、この疾患の原因の一つに細胞内における蛋白質分解系の異常があることが示唆された。従って、本発明のヒト26Sプロテアソームを用いることにより、アルツハイマー病のメカニズムの解明やアルツハイマー病の治療および診断に有用である。

【0012】このように、本発明の26Sプロテアソームの使用あるいは測定法の開発は、これらの病態と本酵素との関わり方のヒトにおける治療法および/または診断法の開発に有用である。かかる測定には、例えば通常の免疫測定法が使用でき、本発明の26Sプロテアソームは該測定に使用する抗体の抗原として用いることができる。

【0013】本発明ヒト26Sプロテアソームの特性を有する蛋白質を得る製造方法について、詳述すると、以下の通りである。本発明ヒト26Sプロテアソームはヒトの種々の組織、器官、産生細胞から、より具体的に

は、ヒト腎臓、肝臓、心臓、脳、肺、胸腺、などの各種臓器およびヒト肝癌細胞株、ヒト腎臓細胞株などの樹立細胞株の細胞質画分より得ることができる。上記の細胞質画分の調製は、通常の細胞質分画法によることができる。例えば、上記記載の細胞をホモジネートし、遠心分離することにより、細胞膜、核、ミトコンドリア、リソゾームおよびマイクロソームの分画を除き、その上清を細胞質分画として使用できる。

【0014】かかる細胞質画分からの本発明ヒト26Sプロテアソームの分離、精製は、当該酵素の酵素化学的、物理化学的性質等を利用した各種の処理操作により実施することができる。例えば、これらの分離、精製方法としては、透析法、限外濾過法、ゲル濾過法などの主として分子量の差を利用する方法、イオンクロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティクロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点を利用する方法などが挙げられる。

【0015】しかしながら、ATP依存的にユビキチン結合蛋白質を分解する26Sプロテアソームの分離、精製は既に本発明者等が報告した20Sプロテアソームに比較して、非常に難しい。その理由として、(i) 26Sプロテアソームは、20Sプロテアソームに比較して非常に不安定である、(ii) 26Sプロテアソームの活性を検出するためのアッセイ系の確立が容易でないことによる。

【0016】かかる課題を解決するために、鋭意、検討を重ねた結果、(i) の課題に対しては26S型プロテアソームを安定化させる条件として、グリセリン、2-メルカプトエタノールあるいはジチオスレイトール、そしてATPを分離溶媒中に添加しておくことにより、安定化させることができた。しかしながら、蛋白質の高次構造に影響する処理、クロマトグラフィーを繰り返すと、26Sプロテアソームは、その構成要素に不可逆的に解離した。

【0017】従って、本発明者等は、主として、分子サイズの違いによる分離を基本戦略として、必要に応じて最小限のクロマトグラフィーを操作を行なう分離、精製方法を発明するに至った。より、具体的には、超遠心法により得た細胞質画分をバイオゲルカラム(バイオラッド社製)、ハイドロキシアパタイトカラム、Q-セファロースカラム、グリセロール密度勾配遠心により分離、精製することにより、本発明26Sプロテアソームを精製するに至った。

【0018】次に、(ii) の課題に対しては、26Sプロテアソームの鋭敏なアッセイ法を開発した。一つはユビキチン結合蛋白質分解活性の測定に供する基質蛋白質を安定に確保することにより、酵素活性を定量的に測定することが可能になった。即ち、本発明者等は、ユビキチン依存性蛋白質分解系のよい基質となる<sup>125</sup>I-リゾ



チームとユビキチンを効率よく結合させる方法を開発した[Tamura T., et al., FEBS Lett., 292, 154-158 (1991)]。

【0019】また、本発明者等は、Suc-LLVY-MCA の分解に対して、20Sプロテアソームは、不活性型であるが、26Sプロテアソームは活性型であることを見だし、Suc-LLVY-MCA の分解活性を調べることにより、26Sプロテアソームを簡便に検知する方法を開発した。従って、この簡便なアッセイ法と上記記載のより、定量性の優れた<sup>125</sup>I-リゾチーム-ユビキチン結合蛋白質の分解活性を調べることにより、26Sプロテアソーム精製の指標にした。上記、分離、精製操作により、得られた本発明ヒト26Sプロテアソームは、前記した酵素学および物理化学的性質より特定される。

【0020】なお、本発明および図面において試薬や分析法などを略号で表示する場合、IUPAC-IUBによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を次に挙げる。

【0021】Suc-LLVY-MCA      サクシニル-ロイシル-ロイシル-バリル-チロシン-4-メチルクマリル-7-アミド (Succinyl-Leucyl-Leucyl-Valyl-Tyrosine-4-Methyl-Coumaryl-7-Amide)

SDS                      ドデシル硫酸ナトリウム (Sodium Dodecyl Sulphate)

PAGE                    ポリアクリルアミド電気泳動 (Polyacrylamide gel electrophoresis)

【0022】

【実施例】以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0023】実施例1

ヒト26Sプロテアソームの精製におけるアッセイ法

(1) ユビキチン化蛋白質の分解活性

<sup>125</sup>I-リゾチーム-ユビキチン 結合体は、本発明者等の方法 [Tamura T., et al., FEBS Lett., 292, 154-158 (1991)]に従い、<sup>125</sup>I-リゾチームとユビキチン結合体をユビキチン結合酵素系 (E1、E2、E3) を用いて結合した。次いで、<sup>125</sup>I-リゾチーム-ユビキチン結合体 (5,000-10,000 cpm) と26Sプロテアソームを50mM Tris-HCl (pH7.5)、5mM MgCl<sub>2</sub>、2mM ATP、1mM ジチオスレイトール中 (最終体積で100mlになるようにする) で、37℃、60-120分間、インキュベートした。

<sup>125</sup>I-リゾチームとユビキチン結合体の分解を調べるために、575mlの10%トリフルオロ酢酸と125mlの4%牛血清アルブミン (キャリア蛋白質) を添加して、酸可溶性画分をγ-カウンターで測定した。

【0024】(2) 合成基質Suc-LLVY-MCA の分解活性  
ペプチド合成基質であるSuc-LLVY-MCA (ペプチド研究所製) と26Sプロテアソームを、0.05% SDS 存在下あるいは、非存在下において、100mM Tris-HCl (pH8.0) 中、37℃、10-30分間インキュベートした。反応は、

100mlの10% SDSと2mlのTris-HCl (pH9.0) を添加し停止させ、反応後の溶液の蛍光を測定した。

【0025】実施例2

ヒト26Sプロテアソームの製造

ヒト26Sプロテアソームの製造は全て、4℃の条件下で行ない、特に述べないかぎり標準液である50mM Tris-HCl (pH7.5)、1mM ジチオスレイトール、5mM MgCl<sub>2</sub>、2mM ATP、20%グリセロールを用いて、以下の順序に従い行なった。

10 【0026】(1) 超遠心法による精製

新鮮なヒト腎臓約100gを50mM Tris-HCl (pH7.5)、1mM ジチオスレイトール、5mM MgCl<sub>2</sub>、2mM ATP、0.25Mスクロース中、ワーリングブレンダーを用いてホモジナイズした。得られたホモジネートは、70,100 x g で1時間超遠心し、得られた上清約4gを出発物質とした。この上清を70,100 x gで5時間遠心し、得られた26Sプロテアソームを含む沈殿を約50mlの標準液に溶かした。さらに、不溶物を除去するために、10,000 gで30分間遠心し、約240mgの蛋白質が回収された。

20

【0027】(2) バイオゲル A-1.5m 分子篩クロマトグラフィーによる精製

超遠心法で得たサンプルをバイオゲル A-1.5m カラム (5 x 90 cm) (バイオラッド社製) にアプライし標準液を用いて60 ml/hrの速度で溶出した。図1に得られたクロマトグラフィーの溶出パターンを示す。図1において横軸はフラクション番号を、縦軸はSuc-LLVY-MCA を分解する活性 (曲線 (1))、0.05% SDS存在下でSuc-LLVY-MCA を分解する活性 (曲線 (2))、ATPase 活性 (曲線 (3))、蛋白質濃度 (曲線 (4)) を示す。また、上段には、各フラクション番号における抗ヒトプロテアソームモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を用いたウェスタン・ブロッティングの結果を示す。

30

【0028】バーA (フラクション番号80-90)、バーB (フラクション番号100-115) のフラクション画分を比較すると、A画分は0.05% SDSが存在しなくてもSuc-LLVY-MCA を分解する活性があるが、B画分は0.05% SDSが存在してはじめてSuc-LLVY-MCA を分解する活性が現われた。また、この図中には示していないがA画分には、<sup>125</sup>I-リゾチームとユビキチン結合体を分解する活性があるが、Bにはなかった。さらにA、B両画分中には、ウェスタンブロッティングの結果から、プロテアソームのコンポーネントが含まれることがわかった。これらのことより、A画分は26Sプロテアソームであり、B画分は20Sプロテアソームであることがわかった。

40

【0029】(3) ハイドロキシアパタイトとQ-セファロースカラムによる精製

バイオゲル A-1.5m カラムより得られた26Sプロテアソームを含むA画分を10mM リン酸カリウム緩衝液 (p

50

H6.8)、1 mM ジチオスレイトール、2 mM ATP、20 %グリセロールで平衡化したハイドロキシアパタイトカラム(1.5 x 15 cm) (バイオラッド社製) にアブライした。カラムは5 ベッド体積の同上緩衝液で洗浄後、吸着したサンプルは3 ベッド体積の0.1M リン酸カリウム緩衝液(pH6.8)、1 mM ジチオスレイトール、2 mM ATP、20 %グリセロールで溶出した。

【0030】溶出サンプルは標準液で平衡化したQ-セファロースカラム(1.5 x 15 cm) (ファルマシア社製) にアブライした。アブライした大部分の蛋白質はQ-セファロースカラムに吸着した。カラムを5 ベッド体積の標準液で洗浄後、吸着した蛋白質を200 mlの0.8M NaClの直線勾配により溶出し、1.4 mlずつ溶出画分を集めた。図2 (A) にQ-セファロースによる溶出パターンを示す。図において、横軸はフラクション番号を、縦軸はSuc-LLVY-MCA を分解する活性(曲線(1))、0.05 % SDS存在下でSuc-LLVY-MCA を分解する活性(曲線(2))、ATPase活性(曲線(3))、NaClのグラディエント濃度(曲線(4))を示す。また、図2 (B) には、バイオゲル A-1.5m カラムより得られた20 Sプロテアソーム画分の分離パターンを(A)と同様に示す。図2 (A) より、26 Sプロテアソーム画分は0.38Mの塩濃度で溶出され、0.05 % SDSの存在の有無にかかわらずでSuc-LLVY-MCA を分解する活性を有するが、図2 (B) より、20 Sプロテアソーム画分は0.05 % SDSが存在しないと、Suc-LLVY-MCA を分解する活性を有さないことがわかった。

#### 【0031】

##### (4) グリセロール密度勾配遠心法による精製

Q-セファロースクロマトグラフィーより得られた26 S、20 S画分はそれぞれアミコンPM-10メンブランを用いた限外濾過により、濃縮し、グリセロール密度勾配遠心を行なった。その結果を図3に示す。図3において、(A)、(B)はそれぞれ26 S画分、20 S画分の分離パターンを示す。また、横軸はフラクション番号を、縦軸は、Suvc-LLVY-MCA を分解する活性(曲線(1))、0.05 % SDS存在下でSuvc-LLVY-MCA を分解する活性(曲線(2)) ATPase活性(曲線(3))、ATP依存的に<sup>125</sup>I-リゾチーム-ユビキチン結合体を分解する活性(曲線(4))を示す。

【0032】図3 (A) の26 S画分において、フラクション番号14-16に26 Sプロテアソームの特徴である<sup>125</sup>I-リゾチーム-ユビキチン複合体を分解する活性および0.05 % SDSの存在の有無にかかわらずでSuc-LLVY-MCA を分解する活性がみられたが、(B)の20 S画分においてはみられず、フラクション番号18-20に20 Sプロテアソームの活性のみがみられた。

【0033】最終的にフラクション番号14-16の画分を集めることにより、26 Sプロテアソームを精製す

るに至った。その蛋白質量を測定すると、0.6 mgであり、<sup>125</sup>I-リゾチーム-ユビキチン結合体を分解する活性は10 % /hr/μg prote-in、ATPase活性は150-200 nmoles/hr/μg protein、Suc-LLVY-MCAを分解する活性は10-20 nmoles/min/μg proteinであった。また、この精製26 Sプロテアソームの沈降係数を超遠心法で測定したところ約26 Sであった。またこの値と拡散係数から、求めた分子量は約2,000 kDaであった。

#### 10 【0034】実施例3

##### 26 Sプロテアソームの電気泳動による構造解析

##### (1) SDS-ポリアクリルアミド電気泳動による解析

実施例2 (4) で精製した26 Sプロテアソームの分子構造を明かにするために、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)により解析した。グリセロール密度勾配により得られたフラクションを1 % SDSで変性後、10-20 %の濃度勾配ポリアクリルアミドゲルにより分離し、銀染色を行なった。その結果を図4に示す。グリセロール密度勾配により得られたフラクション番号14-16の画分に26 Sプロテアソームの活性が存在するが、この画分には21-110 kDaのバンドが確認された。従って、26 Sプロテアソームは21-31 kDaの20 Sプロテアソームと35-110 kDaの制御因子蛋白質群より構成される巨大な複合体蛋白質であることがわかった。

##### 【0035】(2) 2次元電気泳動による解析

26 Sプロテアソームの分子構成をさらに明かにするために1次元目に未変性のPAGEを、2次元目にSDS-PAGEを行なう2次元電気泳動を行ない、銀染色した。その結果を図5に示す。実施例2 (4) で精製した26 Sプロテアソームを3-10 %の未変性のポリアクリルアミドゲルで分離したところ、1,300 kDa (1)、1,100 kDa (2)、700 kDa (3)の3本のバンドが確認された。

【0036】さらに、2次元目に10-20 %のSDS-PAGEを行なったところ、700 kDa複合体は、21-31 kDaの20 Sプロテアソームのコンポーネントと50 kDaのコンポーネントより構成されていることがわかった。一方、1,300 kDaの複合体は21-31 kDaと35-110 kDaより構成され、1,100 kDaの複合体も1,300 kDaの分離パターンに類似していた。これらのことより、1,100 kDaと700 kDaの複合体は1,300 kDaの複合体が一部分解したものであり、26 Sプロテアソームは、電気泳動上は、1,300 kDaの複合体であることがわかった。

#### 【0037】実施例4

##### 26 Sプロテアソームのユビキチン結合蛋白質の分解活性

50 実施例2 (4) で精製した26 Sプロテアソームのユビ

キチン結合蛋白質に対する分解活性を調べた。ユビキチン結合蛋白質として、 $^{125}\text{I}$ -リゾチーム-ユビキチン複合体を用い、 $2\text{mM}$  ATP存在下、精製26Sプロテアソームを2時間反応させた後、SDS-PAGEを行ない、オートラジオグラフィーを行なった。オートラジオグラムの結果を図6に示す。

【0038】図6において、左端は分子量マーカーを、レーン(1)は26Sプロテアソーム非存在下の場合、レーン(2)、(3)、(4)、(5)はそれぞれ、2、4、8、 $10\mu\text{g}$ の26Sプロテアソームを添加した場合の結果を示す。26Sプロテアソーム非存在下の場合、 $^{125}\text{I}$ -リゾチーム-ユビキチン複合体のバンドが、 $67\text{kDa}$ 以上にみられたが(レーン(1))、26Sプロテアソームを添加した場合は、これらのバンドが消失し、 $^{125}\text{I}$ -リゾチームの $14\text{kDa}$ のバンドのみとなった。これらの結果より、精製26SプロテアソームはATP存在下でユビキチン結合蛋白質を分解する活性があることがわかった。

#### 【0039】実施例5

##### 26SプロテアソームのATPase活性

実施例2(4)で精製した26SプロテアソームのATPase活性について、ATPaseの阻害剤を用いて調べた。その結果を図7に示す。図7において、横軸は、ATPase阻害剤であるヴァナデイト(A)とヘミン(B)の添加濃度を、縦軸は、ATP存在下の $^{125}\text{I}$ -リゾチーム-ユビキチン複合体の分解活性(曲線(1))およびATP分解活性(曲線(2))を示す。

【0040】26SプロテアソームにはATP分解活性があることを実施例2(4)で記載したが、この活性はATPase阻害剤であるヴァナデイトとヘミンの添加により、濃度依存的に阻害される。また、この際、 $^{125}\text{I}$ -リゾチーム-ユビキチン複合体の分解活性も同様に阻害された。これらの結果より、26SプロテアソームのATP依存性のユビキチン化蛋白質の分解には、ATPの分解が必要であることがわかった。

#### 【0041】実施例6

##### ヒト26Sプロテアソームの形状

ヒト26Sプロテアソームを $50\mu\text{g/ml}$ に調製し、1-3%ウラニル酢酸(pH4.5)で支持膜上に逆染色し、電子顕微鏡(日立社製、H7000)で観察した。図8に、電子顕微鏡写真より得られた写真を基に26Sプロテアソームの分子構造モデルを示す。この図8で示されるように26Sプロテアソームの分子形状はダンベル状で、その中央部には20Sプロテアソームの構造が認められた。

#### 【0042】

【発明の効果】以上詳述したように、本発明は、ユビキチン化した蛋白質を分解する新規細胞内多機能プロテアーゼであるヒト26Sプロテアソームを精製し、単離することにより、当該酵素の詳細を明らかにしたものであり、これにより、当該酵素の機能とユビキチン化した蛋白質の分解機構の解明に役立つのみならず、各種病態の診断、および治療法として役立つ新しい技術を提供し得る等の効果を有する。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明ヒト26Sプロテアソームのバイオゲルカラムによる精製における溶出パターンを示す。

【図2】本発明ヒト26SプロテアソームのQ-セファロースカラムによる精製における溶出パターンを示す。

【図3】本発明ヒト26Sプロテアソームのグリセロール密度勾配遠心法による精製における分画パターンを示す。

【図4】本発明ヒト26SプロテアソームのSDS-PAGEによる分析結果を示す。

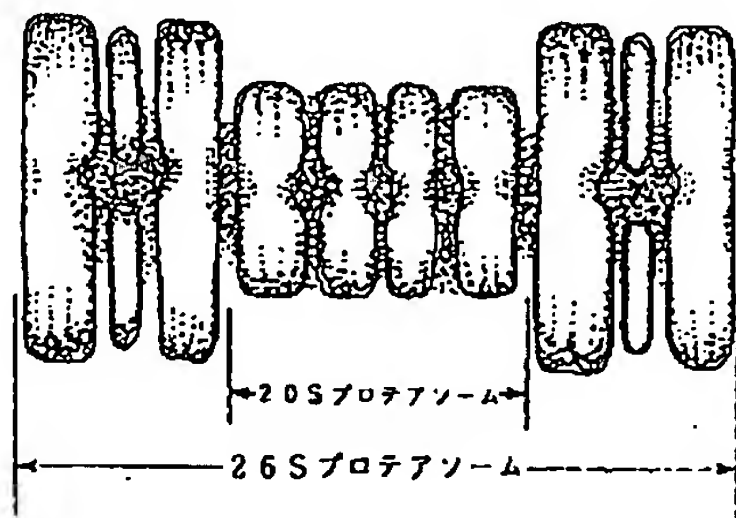
【図5】本発明ヒト26Sプロテアソームの2次元電気泳動による分析結果を示す。

【図6】本発明ヒト26Sプロテアソームによるユビキチンが結合したリゾチーム蛋白質の分解をSDS-PAGEで分析した結果を示す。

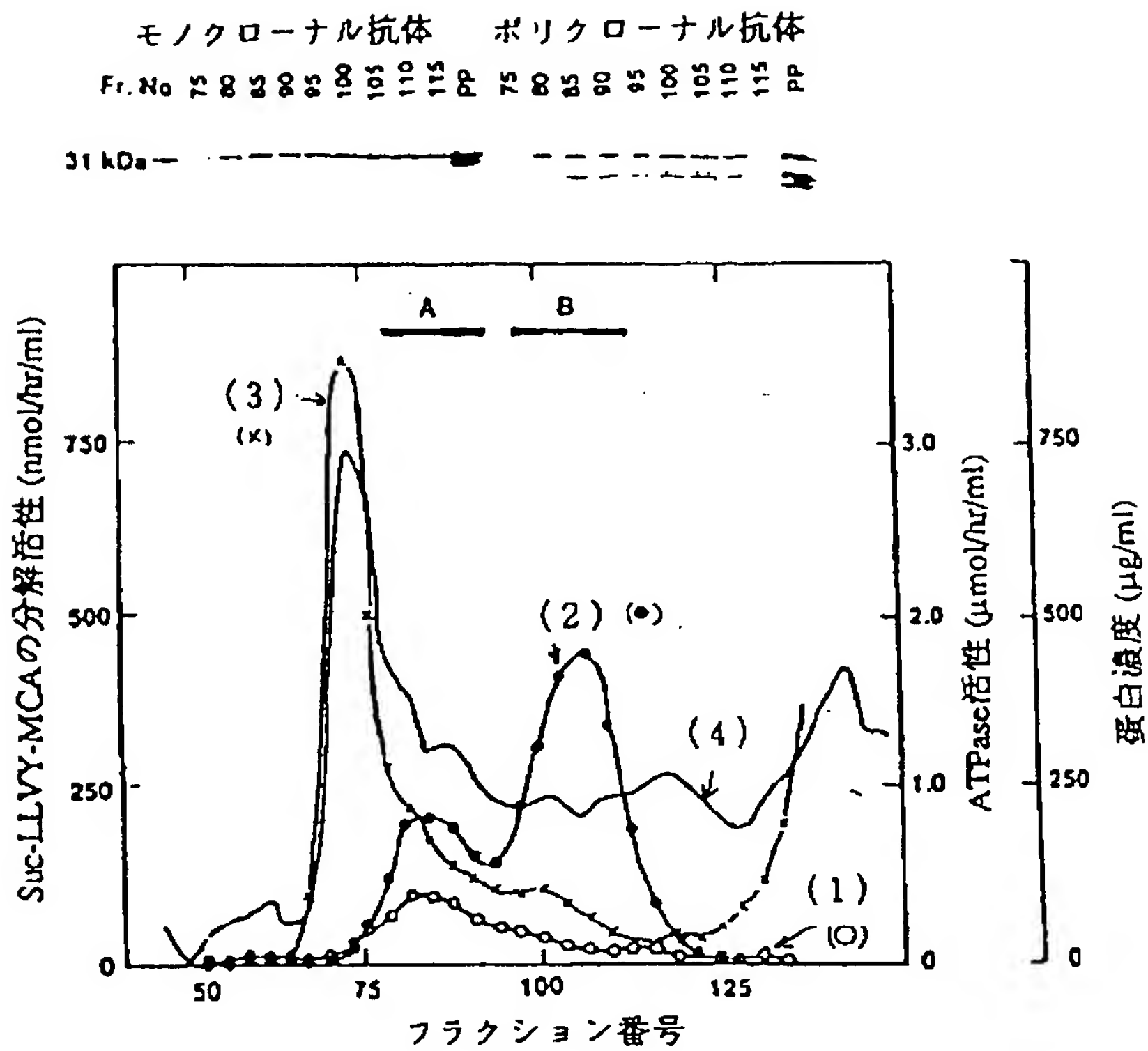
【図7】本発明ヒト26Sプロテアソームのユビキチン結合蛋白質の分解に及ぼすATPase阻害剤およびヘミンの添加効果を示す。

【図8】本発明ヒト26Sプロテアソームの形状を電子顕微鏡写真を基に作製した分子構造モデルを示す。

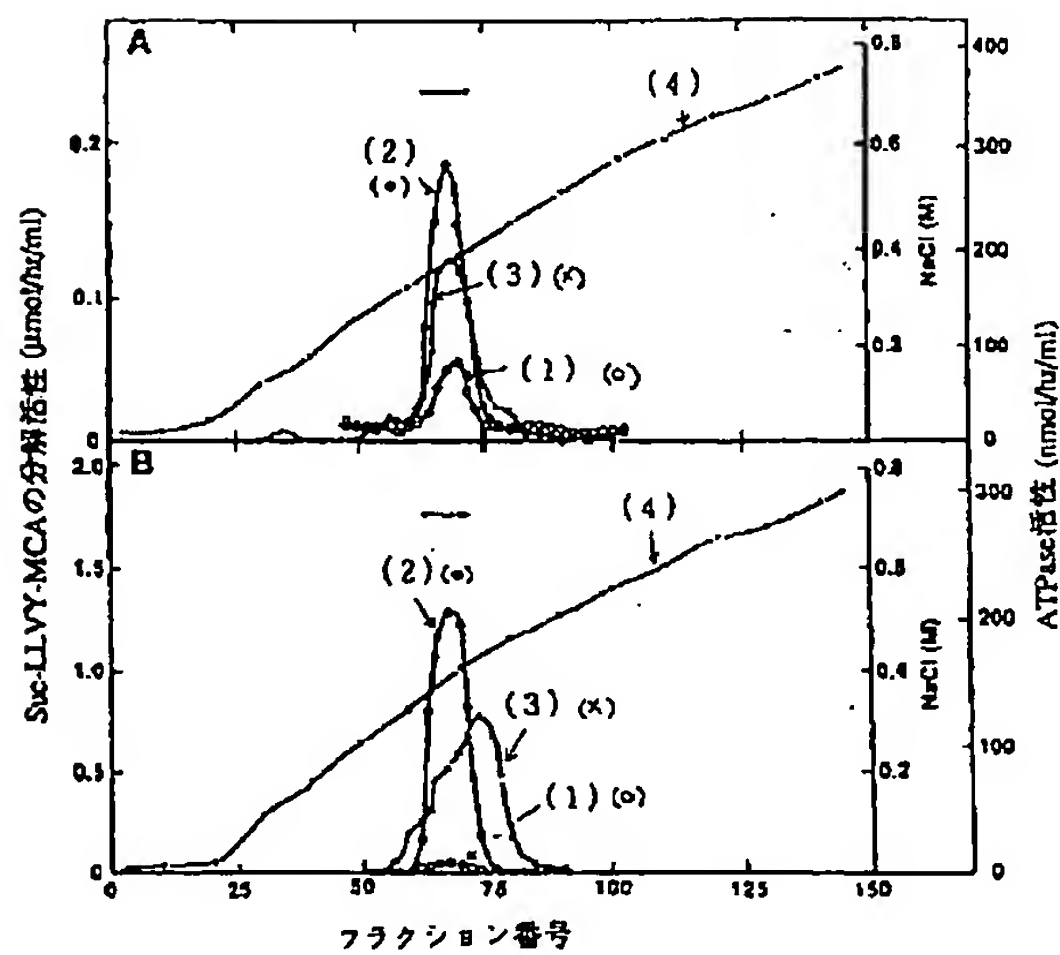
【図8】



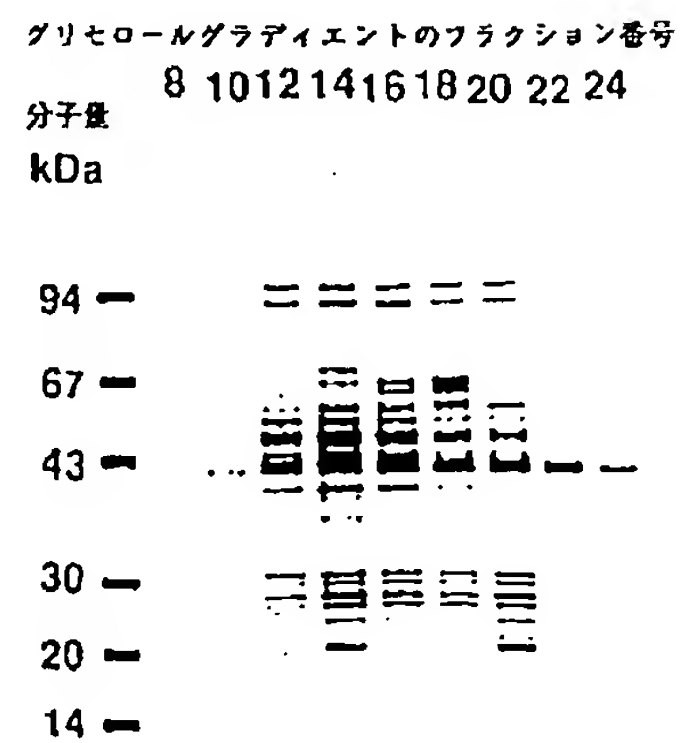
【図1】



【図2】

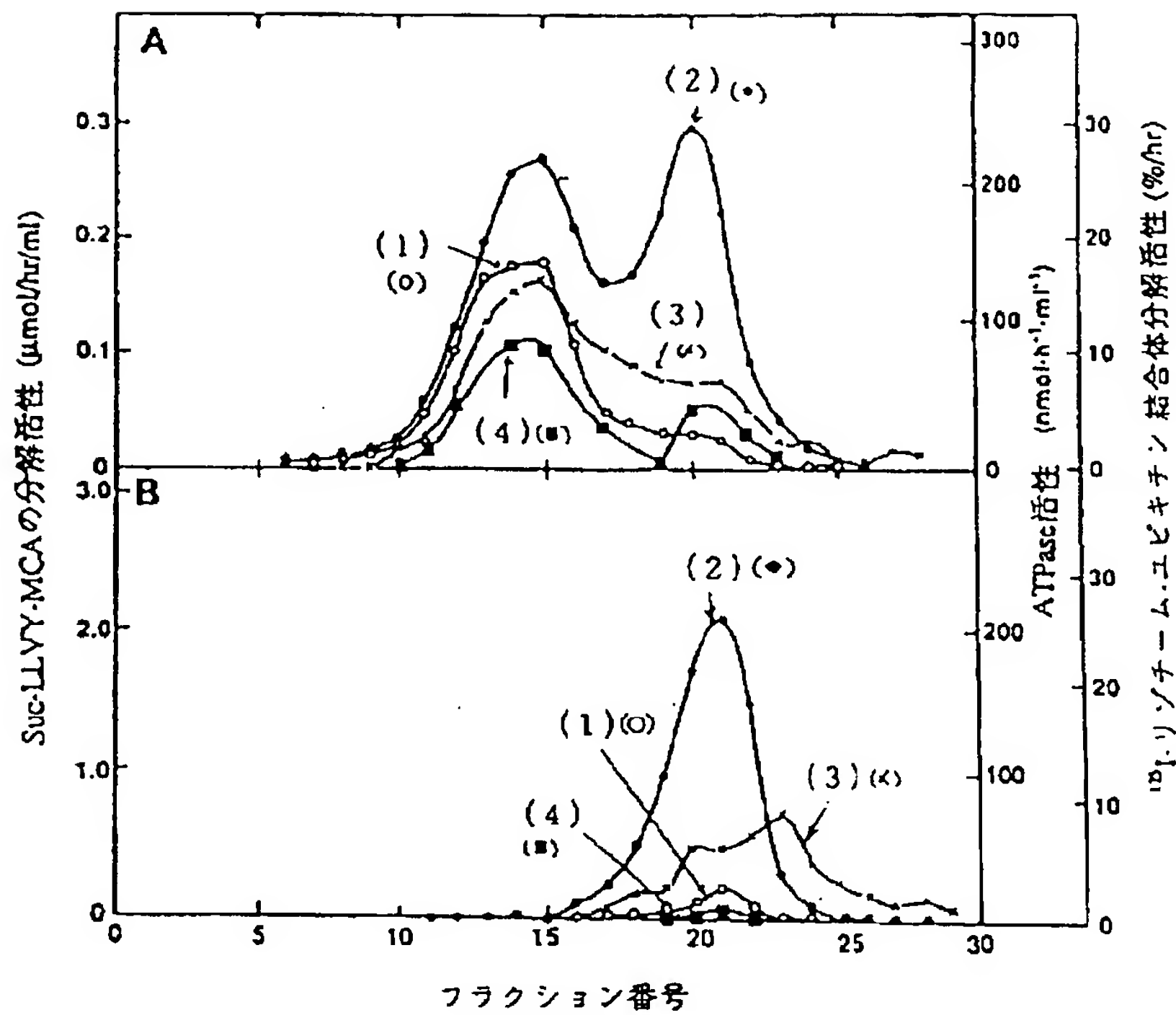


【図4】

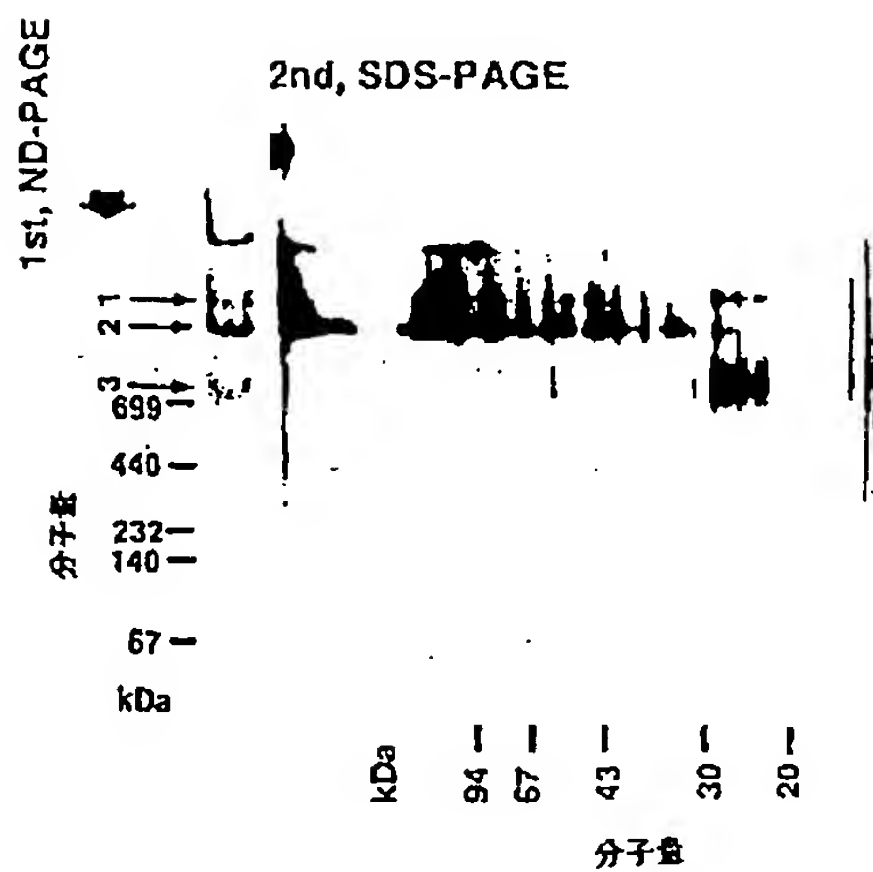




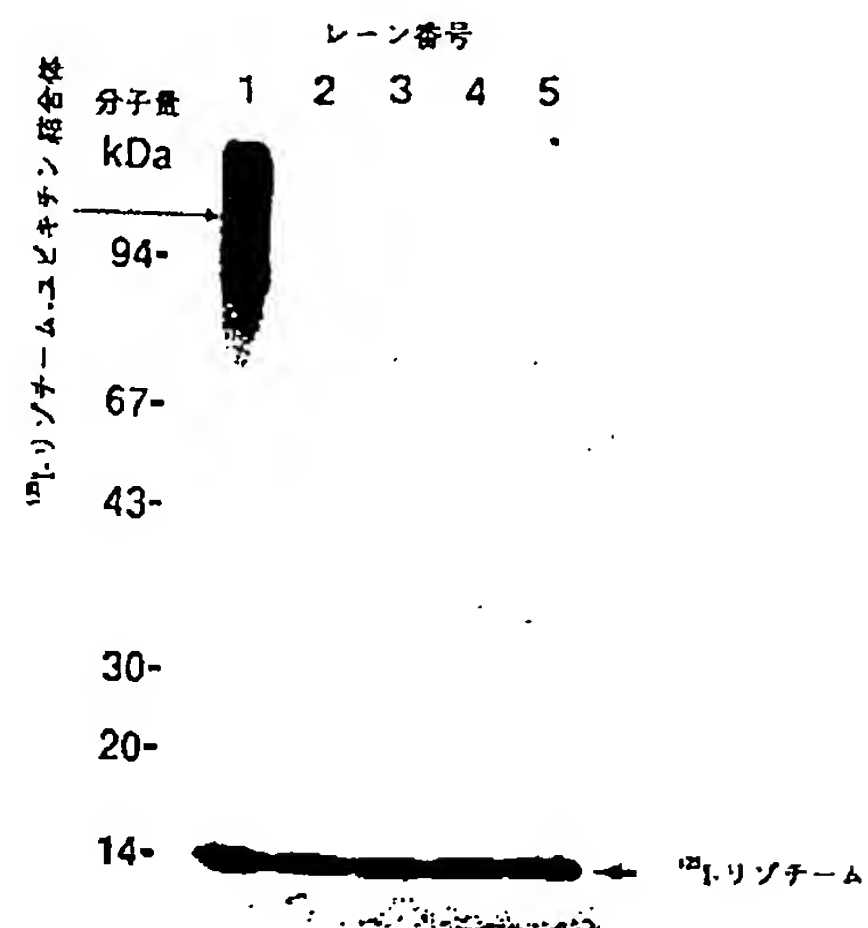
【図3】



【図5】



【図6】



【図7】

